云 南 植 物 研 究 2010，**32**(1)：32～40
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724/SP.J.1143.2010.09182

茶树胞质型苹果酸脱氢酶的原核表达及生物信息学分析*

陈露露[1]，翟羽佳[1]，王 鹏[1]，王 晖[1,2]，
郝家胜[1,2]，朱国萍[1,2]**
（1 安徽师范大学生命科学学院分子进化与生物多样性重点实验室，安徽 芜湖 241000；
2 生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室，安徽 芜湖 241000）

摘要：利用 RT-PCR 及 cDNA 末端快速扩增法，获得了完整的茶树细胞质苹果酸脱氢酶（cMDH）基因 *Cs-cMDH*（GenBank 登录号为 GQ845406）。该基因全长 1 235 bp，编码 332 个氨基酸，分子量约为 35.5 kD。含重组质粒 pGEX-MDH 的 *E. coli* Rosetta 经 0.5 mmol·L^{-1} IPTG 于 32℃ 诱导 3 h 后可以获得大量可溶性的 61.5 kD 融合蛋白。NCBI 的 BLAST 结果显示，Cs-cMDH 与高等植物 cMDH 的氨基酸序列一致性高达 88%～93%。通过基于蛋白质结构的多序列比对，预测 Cs-cMDH 为二聚体，每个亚基包含 13 个 β-折叠及 13 个 α-螺旋。Cs-cMDH 包含典型的 MDH“指纹”（fingerprint）序列 G^{12}AAGQIG^{18}，其氨基酸残基 D^{43} 在所有 NAD-MDH 中都很保守。Cs-cMDH 还包含一些与其它 NAD-MDHs 同源的保守序列单元，如 NAD^{+} 结合位点、催化模体及底物结合位点。而且 Cs-cMDH 还包含在所有植物 NAD-cMDHs 中都相当保守的 6 个 Cys，因此我们推断 Cs-cMDH 为茶树细胞质 NAD-MDH。茶树基础代谢相关基因 *cMDH* 的克隆和原核表达为 *Cs-cMDH* 的功能研究奠定了基础。

关键词：茶树；胞质型苹果酸脱氢酶；RT-PCR；cDNA 末端快速扩增法；序列分析；二级结构；
中图分类号：Q 78，Q 943 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2700(2010)01-032-09

Prokaryotic Expression and Bioinformatics Analysis of Cytosolic Malate Dehydrogenase from *Camellia sinensis*（Theaceae）

CHEN Lu-Lu[1]，ZHAI Yu-Jia[1]，WANG Peng[1]，Wang Hui[1,2]，
HAO Jia-Sheng[1,2]，ZHU Guo-Ping[1,2]**
（1 *The Key Laboratory of Molecular Evolution and Biodiversity*，*College of Life Sciences*，*Anhui Normal University*，Wuhu 241000，China；2 *Anhui Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Security*，Wuhu 241000，China）

Abstract：The complete gene of cytosolic malate dehydrogenase（cMDH）from *Camellia sinensis*，called *Cs-cMDH*，was obtained by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends（GenBank accession number GQ845406）. This gene was 1 235 bp in length，encoding a protein of 332 amino acids with the putative molecular weight of 35.5 kD. The *E. coli* Rosetta（DE3）harboring pGEX-MDH was induced by 0.5 mmol·L^{-1} IPTG at 32℃ for 3 hours，and a 61.5 kD glutathione Stransferase（GST）-fused MDH was obtained in soluble form. The results of NCBI-BLAST revealed that Cs-cMDH shared 88%－93% of amino acid sequence identity with other cMDH from different higher plants. According to the multiple sequence alignment based on the three-dimensional structure of protein，Cs-cMDH was predicted to be a dimer with thirteen β-sheet and thirteen α-helix of each subunit. Cs-cMDH contains typical fingerprint sequence（G^{12}AAGQIG^{18}）as all

* 基金项目：国家自然科学基金（30500300；30870062）；教育部新世纪优秀人才支持计划（NCET-06-0558）；教育部留学回国人员启动基金；安徽省优秀青年科技基金（06043089；08040106811）；重要生物资源保护与利用研究安徽省重点实验室资助
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：gpz1996@yahoo.com
收稿日期：2009-09-14，2009-12-07 接受发表
作者简介：陈露露（1986－）女，在读硕士研究生，主要从事植物分子系统学与分子生物学的研究。

MDHs. The amino acid D^{43} in Cs-cMDH is conserved in all NAD-MDHs. Cs-cMDH also has some conserved sequence units homologous to other NAD-MDHs, such as NAD^+ binding sites, catalytic motif and substrate binding sites. Moreover, Cs-cMDH contains six Cys which are highly conserved in all plant NAD-cMDHs. Therefore, Cs-cMDH was inferred to be NAD-dependent cMDH. The present study may provide the fundament for the further functional characterization of *Cs-cMDH*.

Key words: *Camellia sinensis*; Cytosolic malate dehydrogenase; RT-PCR; Rapid amplification of cDNA ends; Sequence analysis; Secondary structure

苹果酸脱氢酶（malate dehydrogenase，MDH）广泛存在于生物体内，主要催化草酰乙酸和苹果酸之间的可逆转化，参与调节三羧酸循环、乙醛酸通路、氨基酸合成、葡萄糖异生、氧化还原平衡的维持以及细胞质基质和细胞器之间的物质交换。已知的 MDH 是由相同或相似亚基组成的二聚体或四聚体酶（Musrati 等，1998），在大多数生物体内 MDH 以同源二聚体形式存在。NAD-依赖型 MDH（NAD-MDH）和 NADP-依赖型 MDH（NADP-MDH）的亚基分子量分别为 32.5～37 kD 和 42～43 kD（Ocheretina and Scheibe，1997）。根据辅酶特异性、亚细胞定位以及生物学功能，植物 MDH 主要分为 5 种形式：细胞质 NAD-MDH（cMDH 或 cyMDH）、线粒体 NAD-MDH（mMDH）、叶绿体 NADP-MDH（chMDH）、叶绿体 NAD-MDH（cnMDH）以及乙醛酸体 NAD-MDH（gMDH）（Ocheretina and Scheibe，1997；Gietl，1992）。

目前植物的 mMDH、chMDH 和 cnMDH 已经被广泛研究（Gietl，1992），而关于 cMDH 的研究报道不多（Ocheretina and Scheibe，1997；Miller 等，1998）。cMDH 作为苹果酸代谢的关键酶之一，在细胞质基质中和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）一起催化合成苹果酸（Chollet 等，1996），同时为细胞质基质和细胞器之间的多种穿梭系统提供底物和还原力（Heber，1974），如细胞质和线粒体之间的苹果酸/天冬氨酸和苹果酸/草酰乙酸穿梭系统。cMDH 还对核酸选择性通道和糖异生作用有一定的影响（Hanss 等，2002；Gibson and McAlister-Henn，2003）。另外转基因研究发现，在苜蓿中超量表达 MDH 基因后，提高了苜蓿对酸性土壤和铝毒的耐受性（罗小英和崔衍波，2004）。

茶树（*Camellia sinensis*）为多年生常绿木本植物，是一种世界范围内的广泛流行饮品，具有重大的经济价值，它的次生代谢物更是有着极大的医学价值（Singh 等，2009）。目前茶树次生代谢物的研究比较广泛，但关于茶树基础代谢酶类的研究不多，迄今茶树 MDH 的研究尚未见报道。本文中我们采用 cDNA 快速末端扩增法（rapid amplification of cDNA ends，RACE）获得茶树细胞质苹果酸脱氢酶基因（*Cs-cMDH*），实现了其在大肠杆菌中的异源表达，并通过生物信息学手段，对 Cs-cMDH 的氨基酸序列进行了分析、二级结构预测及三维结构的同源建模。

1　材料和方法

1.1　材料来源

供试茶树品种为安徽农业大学茶园苗圃的春季龙井 43 一芽二叶新梢，取样后迅速用液氮冷冻，立即保存于 −80℃ 冰箱中备用。

1.2　总 RNA 的提取与 cDNA 的获得

采用 SV Total RNA Isolation System（Promega）提取茶叶总 RNA，实验操作按说明书进行。通过紫外分光光度法鉴定总 RNA 的纯度，并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量。以提取的总 RNA 为模板，利用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa）进行逆转录，获得茶树总 cDNA。

1.3　*Cs-cMDH* 基因保守片段的扩增

根据 NCBI GenBank 内已有的胞质型苹果酸脱氢酶基因序列设计简并性引物 *cMDH*-P1 和 *cMDH*-P2（表 1）（Timothy 等，1998）。以茶树总 cDNA 为模板，利用 Go-Taq Green Master Mix 聚合酶（Promega），以 *cMDH*-P1 和 *cMDH*-P2 为引物进行 PCR 扩增，反应程序为：95℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，35 个循环；72℃终止延伸 10 min。将纯化的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，X-Gal/IPTG 平板进行蓝白斑筛选，将阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

表1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物 Primers	序列 (5′～3′) Sequences (5′－3′)
cMDH -P1	GCTACGCCCTGGTGccnatgathgc
cMDH -P2	CGTAGGAGCCGTCGGAGtanacncccat
3′RACE-1	TTTGGGGTAATCATTCCTCAACTCA
3′RACE-2	CTTGGGTTTCTATGGGTGTCTACTC
5′RACE-1	ACGCATTGGTGTTGGCAGGGTTA
5′RACE-2	AGCCGTCGGAGTAGACACCCATAGA
cMDH -F1	GAGATCGC GGATCCATGGCGAAAGAACCAGTTCG
cMDH -F2	GTACGCCG CTCGAGAGAAAGGCAAGAGTATGCCAGA

1.4 *Cs-cMDH* 基因的5′RACE 和3′RACE

根据已获得的 *Cs-cMDH* 基因保守片段设计 4 个基因特异性引物，分别为 5′RACE-1 和 5′RACE-2 以及 3′RACE-1 和 3′RACE-2（表 1）。以茶树总 cDNA 为模板，利用 GeneRacer™ Kit（Invitrogen）获得基因的 3′和 5′序列，具体操作详见说明书。将获得的 2 个片段纯化后克隆入 pMD19-T 载体，将筛选的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 *Cs-cMDH* 基因全长 cDNA 的获得

利用 DNAMAN 软件将以上获得的三段序列进行拼接，获得全长 cDNA 序列。设计引物 *cMDH* -F1 和 *cMDH* -F2（表 1），以茶树总 cDNA 为模板，使用高保真酶 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase（TaKaRa）PCR 扩增 *Cs-cMDH* 基因的 ORF，将获得的 PCR 片段纯化后克隆入 pMD19-T 载体，将筛选的阳性克隆 pMD19-cMDH 送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.6 *Cs-cMDH* 基因的异源表达

设计分别包含 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切位点的引物 *cMDH* -F1 和 *cMDH* -F2（表 1），以 pMD19-cMDH 为模板进行 PCR。将纯化的 PCR 产物经 BamH I 和 Xho I 双酶切后，与 pGEX-4T-1 质粒连接，转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，获得重组质粒 pGEX-MDH。经测序鉴定后，将 pGEX-MDH 转入 *E. coli* Rosetta，挑单菌落 37℃ 培养过夜，次日按照 1∶100 的接种量接入 50 ml LB 液体培养基中，振荡培养至 A_{600} 为 0.6 时，加入终浓度为 0.5 mmol·L^{-1} 的 IPTG，32℃ 诱导 3 h，4℃ 离心收集菌体。将菌体悬浮于破碎缓冲液中，超声波破碎细胞（破碎 12 s，间隔 28 s，共破碎 6 min）。细胞裂解液于 12 000 r/min 离心 20 min，取上清进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.7 Cs-cMDH 的氨基酸序列及理化性质分析

利用软件 ProtParam（http://au.expasy.org/tools/protparam.html）计算 Cs-cMDH 的氨基酸序列组成、相对分子量、理论等电点等理化性质；应用 Bioedit 软件分析蛋白质的疏水性。

1.8 Cs-cMDH 的氨基酸序列分析及结构预测

利用 NCBI 数据库的 BLAST 程序对 Cs-cMDH 进行氨基酸序列一致性分析。利用软件 ESPript 2.2（http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/）对 Cs-cMDH 进行二级结构的预测。利用软件 Swiss-Model（http://swissmodel.expasy.org/）对 Cs-cMDH 进行三维结构的同源建模。

2 结果

2.1 茶树总 RNA 的提取

茶树总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测呈现出 2 条清晰的条带（图 1），分别为 28S 和 18S rRNA。28S rRNA 的亮度约是 18S rRNA 亮度的两倍，表明总 RNA 基本无降解。

2.2 全长 *Cs-cMDH* 基因的获得

利用简并引物 *cMDH* -P1 和 *cMDH* -P2 进行 PCR 扩增获得 779 bp 的片段（图 2a），在 GenBank 进行 BLASTn 比对，结果显示为植物 cMDH 的保守片段。然后利用 3′RACE 和 5′RACE 技术

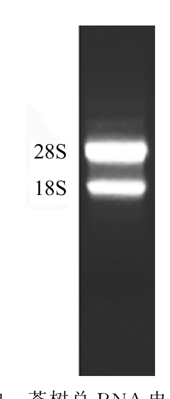


图 1 茶树总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the total RNA from *Camellia sinensis*

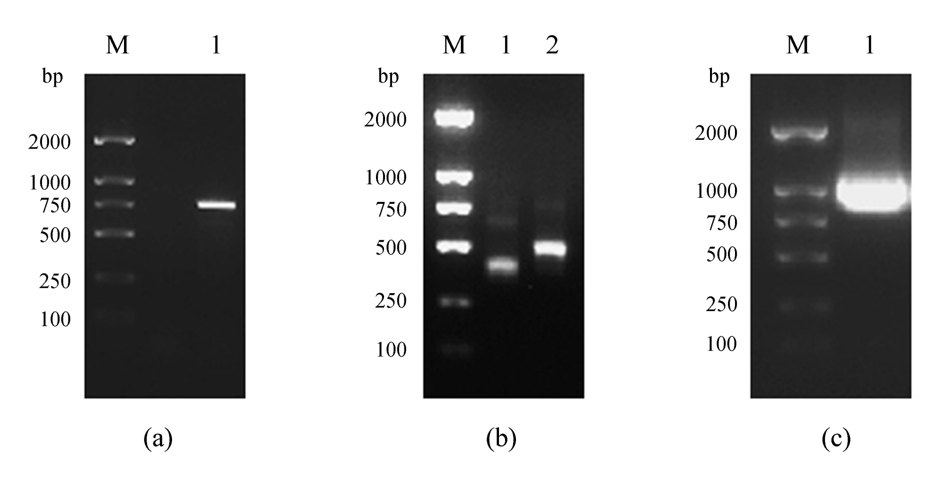


图 2　Cs-cMDH 基因的 PCR 扩增

(a) *Cs-cMDH* 基因保守片段的 PCR 扩增（M：DNA 标准分子量 DL2000；1：*Cs-cMDH* 保守片段）；(b) 3′RACE 和 5′RACE 扩增产物（M：DNA 标准分子量 DL2000；1：3′端 RACE 产物；2：5′端 RACE 产物）；(c) *Cs-cMDH* 基因编码区的扩增产物（M：DNA 标准分子量 DL2000；1：*Cs-cMDH* 基因编码区）

Fig. 2　PCR amplification of *Cs-cMDH* gene from *Camellia sinensis*

(a) The conserved fragment of *Cs-cMDH* gene by PCR (M: Marker DL2000; Lane 1: the conserved fragment of *Cs-cMDH* gene); (b) 5′ and 3′ RACE fragments (M: Marker DL2000; Lane 1: 3′ RACE fragment; Lane 2: 5′RACE fragment); (c) Full-length *Cs-cMDH* gene (M: Marker DL2000; Lane 1: Coding sequence of *Cs-cMDH* gene)

分别获得 378 bp 和 477 bp 的片段（图 2b）。用 DNAMAN 将 3 个片段拼接获得 1 235 bp 的完整 cDNA 序列，编码 332 个氨基酸。应用 NCBI 的 ORF 程序显示 *Cs-cMDH* 基因包含 62 bp 长的 5′非编码区、ATG 起始密码子、999 bp 的基因编码区（图 2c）、TAG 终止密码子及 22 bp 的 poly (A) 尾巴和 174 bp 的 3′非编码区。此基因已登录 GenBank，登录号为 GQ845406。

2.3　Cs-cMDH 的氨基酸序列及理化性质分析

用 ProtParam 软件预测 Cs-cMDH 的理化性质得出其亚基理论分子量为 35.557 kD，理论等电点为 5.91，此蛋白中含量比较多的氨基酸是 Ala、Val 和 Leu，含量比较少的氨基酸是 Phe、His 和 Trp，不稳定系数为 33.93，属于稳定蛋白。利用 Bioedit 软件来检测 Cs-cMDH 蛋白的疏水性（Kyte and Doolittle，1982）。分析发现，Cs-cMDH 的 N 端存在明显的疏水区，这一结构同样存在于动植物以及细菌的 cMDH 当中（Ding and Ma，2004）。Cs-cMDH 蛋白的平均亲水性值（Grand average of hydropathicity，GRAVY）为 0.133，预测该蛋白质为疏水性蛋白质，这很可能与其含有较多的 Ala、Val 和 Leu 有关。

2.4　Cs-cMDH 的异源表达

以 pMD19-cMDH 为模板 PCR 扩增 *Cs-cMDH* 基因的 ORF，克隆入原核表达载体 pGEX-4T-1，测序鉴定正确。将重组质粒 pGEX-MDH 转入 *E. coli* Rosetta 中，32℃ 进行 IPTG 诱导表达。12％的 SDS-PAGE 结果显示，重组菌 45 kD 和 66.2 kD 之间有明显的表达产物，分子量约 61.5 kD，如图 3 所示。载体 pGEX-4T-1 带有谷胱甘肽 S 转移酶（glutathione S-transferase，GST）融合标签，GST 大小约为 26 kD，因此茶树细胞质苹果酸脱氢酶的亚基分子量约为 35.5 kD，与理论计算值相近。

2.5　Cs-cMDH 的氨基酸序列分析

利用 BLAST 程序对 Cs-cMDH 与其它物种的苹果酸脱氢酶进行氨基酸序列一致性分析，结果见表 1。序列比对显示，Cs-cMDH 与其它高等植物的 cMDH 具有很高的同源性。它与杨树 cMDH 的序列一致性（identity）达 93％，与拟南芥、葡萄、大豆、烟草、玉米、苹果 cMDH 的同源性均≥90％，与水稻、小麦 cMDH 的同源性均为 88％。Cs-cMDH 与低等植物 cMDH 的同源性略低。Cs-cMDH 与植物叶绿体 NADP-MDH 的序列一致性为 40％～41％，与植物 mMDH 和 gMDH 的同源性较低，一般不高于 30％。Cs-cMDH

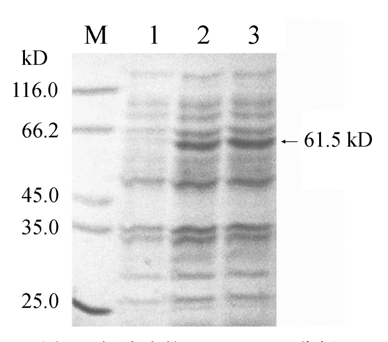


图 3 粗酶液的 SDS-PAGE 分析

M：蛋白质标准分子量；1：0.5 mM IPTG 诱导的空载体对照；2，3：0.5 mM IPTG 诱导的粗酶液

Fig. 3 Analysis of crude extracts by SDS-PAGE

M: protein molecular weight standard; Lane 1 was crude extract of strain carrying pGEX-4T-1 with 0.5 mM ITPG induction; Lanes 2 and 3 were crude extracts of strain carrying pGEX-MDH with 0.5 mM ITPG induction

与动物 cMDH 也具有较高的同源性，如它与猪心 cMDH 的序列一致性达 60%。Cs-cMDH 与猪 mMDH 及古菌的序列一致性较低，小于 30%。

2.6 基于结构的 Cs-cMDH 二级结构及3D 预测

根据蛋白质数据库（PDB）猪心 cMDH（Pig-cMDH）的蛋白质结构（PDB 5mdh）（Chapman 等，1999），对推导的 Cs-cMDH 氨基酸序列进行基于蛋白质结构的 cMDH 多序列比对（图 4）。

预测 Cs-cMDH 为类似猪心 cMDH 的二聚体，每个亚基包含 13 个 β-折叠及 13 个 α-螺旋。根据猪心 cMDH 的蛋白质三维结构（2.4 Å）（PDB 5mdh）（Chapman 等，1999），利用 SWISS-MODEL 建立的 Cs-cMDH 亚基三维结构的同源模型如图 5 所示。

表2 推导的 Cs-cMDH 氨基酸序列与不同物种 MDH 的同源性比较

Table 2 Homology of deduced amino acid sequence of Cs-cMDH with MDHs from various species

Species	Protein	Identity (%)	GenBank accession number
Plant			
Populus trichocarpa	cMDH [a]	93	XP _ 002312583
Arabidopsis thaliana	cMDH	92	NP _ 199147
Vitis vinifera (grape)	cMDH	92	XP _ 002278712
Glycine max (soybean)	cMDH	90	AAS18241
Nicotiana tabacum (tobacco)	cMDH	90	CAC12826
Zea mays (maize)	cMDH	90	NP _ 001105603
Malus x domestica (apple)	cMDH	90	ABB36659
Oryza sativa (rice)	cMDH	88	NP _ 001064860
Triticum aestivum (wheat)	cMDH	88	AAP70009
Chara vulgaris	cMDH	74	CAC79550
Mantoniella squamata	cMDH	73	CAC80840
Micromonas pusilla	cMDH	69	EEH56495
Flaveria Bidentis	chMDH [b] ①	41	P46489
Spinacia oleracea (spinach)	chMDH	41	P52426
Medicago sativa (alfalfa)	chMDH	40	O48902
Pisum sativum (pea)	chMDH	40	P21528
Sorghum bicolor	chMDH ①	40	P17606
Zea mays (maize)	chMDH	40	P15719
Arabidopsis thaliana	cnMDH [c]	30	Q9SN86
Arabidopsis thaliana	mMDH [d]	30	CAA10320
Citrullus lanatus (watermelon)	mMDH	30	P17783
Citrullus lanatus (watermelon)	gMDH [e] ①	26	P19446
Oryza sativa (rice)	gMDH	22	Q42972
Animal			
Sus scrofa (pig)	cMDH ①	60	P11708
Sus scrofa (pig)	mMDH ①	24	P00346
Bacteria			
Thermus flavus	MDH ①	53	CAA38008
Escherichia coli	MDH ①	27	BAB37532
Archaea			
Haloarcula Marismortui	MDH ①	28	AAA73368
Salinibacter ruber	MDH	25	Q2S289

cMDH[a]: cytoplastic MDH. chMDH[b]: chloroplastic NADP-MDH. cnMDH[c]: chloroplastic NAD-MDH. mMDH[d]: mitochondrial MDH. gMDH[e]: glyoxysomal MDH. ①: The crystal structure of protein has been solved to high resolution by x-ray crystallography

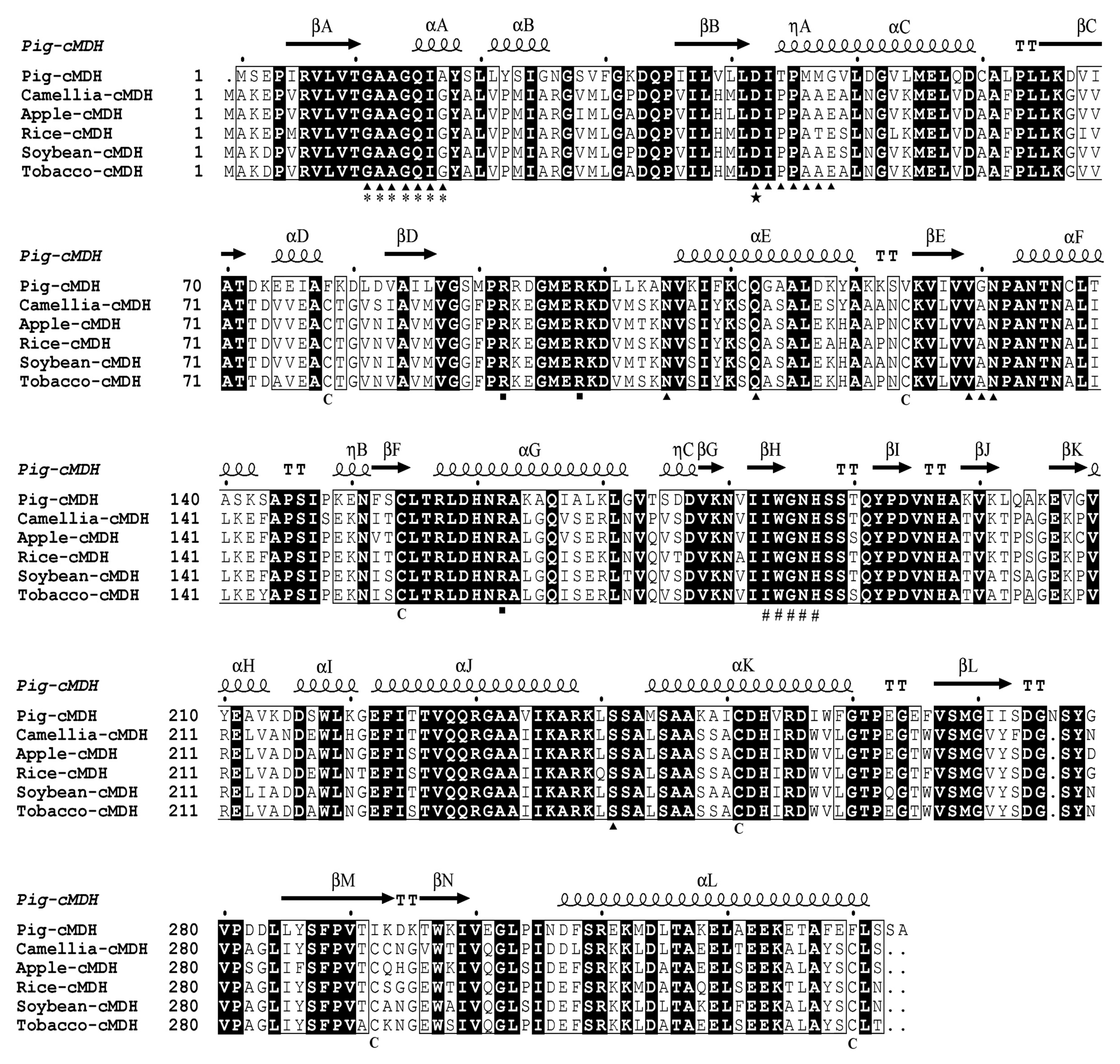


图 4　基于结构信息的 Cs-cMDH 与其它 cMDHs 的多序列比对

Pig-cMDH：来自猪心的 cMDH　（GenBank 登录号为 P11708）；Camellia-cMDH：来自茶树的 cMDH（GQ845406）；Apple-cMDH：来自苹果的 cMDH（ABB36659）；Rice-cMDH：来自水稻的 cMDH（AAG13573）；Soybean-cMDH：来自大豆的 cMDH（AAS18241）；Tobacco-cMDH：来自烟草的 cMDH（CAC12826）。图中以猪心 cMDH 三维结构（5mdh）为基础，猪心 cMDH 的二级结构元件标注在序列顶端，完全保守的氨基酸残基以阴影表示，辅酶 NAD^+ 的结合位点用三角形（▲）表示；MDH 指纹序列用星号（*）表示；底物结合位点用方块（■）表示；决定辅酶特异性的关键位点用五角星（★）表示；催化模体用井号（#）表示；半胱氨酸残基用 C 表示。

Fig. 4　Structure-based multiple sequence alignment of Cs-cMDH and cMDHs from other sources

Pig-cMDH: cMDH from porcine heart (GenBank accession number P11708); Camellia-cMDH: cMDH from *Camellia sinensis* (GQ845406); Apple-cMDH: cMDH from *Malus domestica* (ABB36659); Rice-cMDH: cMDH from *Oryza sativa* (AAG13573); Soybean-cMDH: cMDH from *Glycine max* (AAS18241); Tobacco-cMDH: cMDH from *Nicotiana tabacum* (CAC12826). The sequence alignment was based on the three-dimension structure of pig heart cMDH (5mdh). The secondary structural elements of Pig-cMDH (PDB 5mdh) are placed above the alignment. The completely conserved amino acid residues are shaded. The binding site of coenzyme NAD^+ was represented as triangles (▲); the fingerprint sequence of MDH was represented as asterisk (*); the binding site of substrate was represented as squares (■); the critical site of cofactor specificity was represented as stars (★); the catalytic motif was represented as hashs (#); the cysteine was represented as C

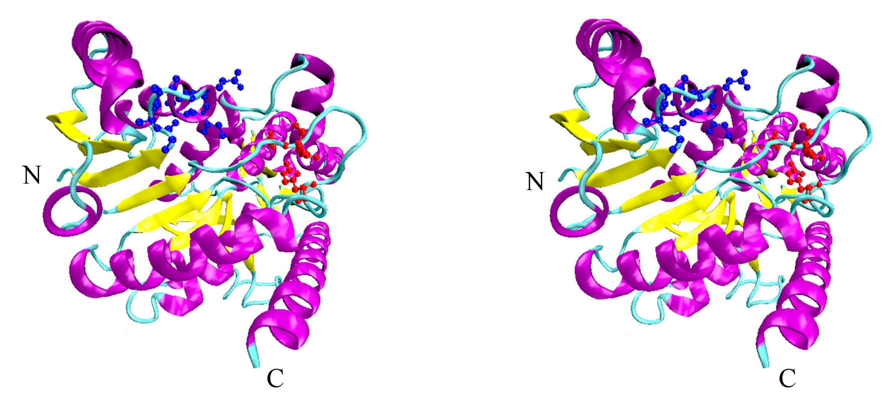


图5　Cs-cMDH亚基预测的三维结构立体视图

图中Cs-cMDH的N端和C端用相应的字母表示，α-螺旋用紫色螺旋表示，β-折叠用黄色箭头表示，转折和卷曲用青色绳索表示，参与辅酶NAD^+结合的MDH指纹序列氨基酸用蓝色表示，参与底物结合的催化残基用红色表示

Fig. 5　Steoreo view of predicted three-dimension structure of Cs-cMDH subunit

The N- and C-termini of Cs-cMDH were represented in capital letters N and C, respectively. The α-helix was represented in purple helix. The β-sheet was represented in yellow arrow. The turn and coil were represented in cyan rope. The fingerprint sequence of MDH involved in the binding site of coenzyme NAD^+ was represented blue. The binding sites of substrate were represented in red

3　讨论

我国是茶树的原产地，是最早发现和利用茶树的国家，并把茶叶发展成为我国和东方乃至整个世界的一种灿烂独特的茶文化。由于茶是一种重要的饮料并具有医学价值，茶树新基因的克隆、表达及功能鉴定工作也一直是分子生物学研究的热点，包括茶树儿茶素类代谢相关基因克隆、茶树咖啡碱合成相关基因克隆、茶树基础代谢相关基因克隆、茶树抗逆性相关基因克隆等（陆建良等，2007）。

本研究进行了茶树基础代谢相关基因的克隆和表达。我们利用GenBank中已报道的植物细胞质MDH序列，设计简并性引物扩增得到茶树cMDH的保守片段，再采用RACE技术成功获得完整的*Cs-cMDH*（Genbank登录号为GQ845406）。由于原核和真核基因在胞内环境存在许多差异，以及被诱导的蛋白常常在短时间内大量产生以至于来不及正确折叠，所以真核基因在原核表达体系中往往形成包涵体而得不到可溶性的活性蛋白。实验中采取降低诱导温度、IPTG梯度诱导、缩短诱导时间的方法，最终经0.5 $mmol \cdot L^{-1}$ IPTG于32℃诱导表达3 h后可以获得大量可溶性融合蛋白（图3）。生物信息学分析显示该基因长1 235 bp，编码332个氨基酸。Cs-cMDH蛋白质含有大量疏水性氨基酸，数目高于其它植物cMDH，为疏水性蛋白。

氨基酸序列一致性分析显示，Cs-cMDH与其它高等植物cMDH的同源性很高，如与大豆、烟草、玉米、苹果cMDH的序列一致性均为90%。Cs-cMDH与动物cMDH也具有较高的同源性，如它与猪心cMDH的序列一致性达60%。Cs-cMDH与植物叶绿体NADP-MDH的序列一致性为40%～41%，与植物mMDH和gMDH的同源性更低，一般不高于30%。因此初步推断我们获得了茶树细胞质MDH。

在真核生物中，cMDH在细胞质和细胞器之间底物和还原当量交换的多种穿梭系统中起重要作用。如细胞质MDH是苹果酸－天冬氨酸穿梭系统中的关键酶之一，而这种穿梭系统对于调节和维持细胞质和线粒体中NAD/NADH比例的平衡至关重要（López-Calcagno等，2009；Easlon等，2008；Ding and Ma，2004）。最新的研究发现，苹果酸－天冬氨酸穿梭系统和甘油磷酸穿梭系统是酵母卡路里限制（calories restrictions）介导的生命寿限延长的新调节因子，并且在卡路里限制条件下，苹果酸－天冬氨酸穿梭系统在NAD^+和NADH跨越线粒体膜的穿梭中扮演着重要角色（Easlon等，2008）。研究还发现，当葡萄糖缺乏时，细胞核质MDH可以调节p53-依赖的细胞周期捕捉和凋亡，暗示细胞核质MDH是p53-依赖性代谢检查点的转录调节因子（Lee等，2009）。另外，cMDH对核酸选择性通

道（Hanss 等，2002）和糖异生功能（Gibson and McAlister-Henn，2003）也有影响。

目前植物中线粒体 NAD-MDH、叶绿体 NADP-MDH 以及微体 NAD-MDH 的研究已经很广泛，但是其它类型的 MDH 研究得较少，尤其对 cMDH 的研究甚少。植物 MDH 已经获得高分辨率 X-衍射晶体结构的有黄顶菊（*Flaveria bidentis*）和高粱（*Sorghum bicolor*）的叶绿体 NADP-MDH、西瓜（*Citrullus lanatus*）的乙醛酸体 NAD-MDH（Johansson 等，1999；Carr 等，1999；Bryan 等，2005），但是植物细胞质 NAD-MDH 和线粒体 NAD-MDH 至今缺乏晶体结构数据。尤其是 cMDH，PDB 中仅有猪心 cMDH 的晶体结构数据（Chapman 等，1999）。

基于猪心 cMDH 蛋白质结构（PDB ID 5mdh）的多重氨基酸序列比对，预测 Cs-cMDH 为类似猪心 cMDH 的二聚体，每个亚基包含 13 个 β-折叠及 13 个 α-螺旋（图 4，5）：Cs-cMDH 包含典型的 MDH“指纹”（fingerprint）序列 G^{12}AAGQIG^{18}，它在所有 MDH 中都相当保守（Johansson 等，1999；Carr 等，1999；Bryan 等，2005）。G^{12}AAGQIG^{18} 和 V^{130}AN^{132} 是 NAD^+ 结合区，D^{43}、N^{106}、Q^{113}、和 S^{242} 是 NAD^+ 结合位点；催化模体（motif）I^{184}WGNH^{188} 中的 H^{188} 是活性部位即质子受体，该位点在 cMDH 中高度保守（Birktoft 等，1982）；Q^{93}、Q^{99} 和 Q^{163} 是底物结合位点（Chapman 等，1999）；和所有植物 cMDH 一样包含 6 个保守的 Cys，C^{252} 和 C^{293} 形成分子内部二硫键，C^{331} 参与形成分子间二硫键（Satoshi 等，2006；Dong 等，1994）。

Cs-cMDH 包含的 D^{43}IPPAAE^{49} 序列在所有 NAD-MDH 中都很保守，在一些细菌 NAD-MDH 中为 E^{41}IPQAMK^{47}（氨基酸编号以嗜热菌 *Thermus flavus* 的 MDH 为准），但是在所有叶绿体 NADP-MDH 中均为 G^{148}SERSFQ（A）^{154}（氨基酸编号以黄顶菊 *Flaveria bidentis* 叶绿体 NADP-MDH 为准）。尤其是 Cs-cMDH 中的 D^{43}，结构生物学分析认为 Asp 带负电荷的侧链占据了 NADP（H）的 2′-磷酸基团需要的结构空间，所以导致所有的 NAD-MDH 只能以 NAD^+ 为辅酶（Carr 等，1999；Isabelle 等，2000）。实验证实，将 *Thermus flavus* 的 MDH 中的 E^{41} 突变为 G^{41} 后，突变体酶对 NAD^+ 的亲和性明显降低，而对 $NADP^+$ 的催化效率明显提高（Nishiyama 等，1993）。因此我们推断 Cs-cMDH 为茶树细胞质 NAD-依赖型苹果酸脱氢酶。

近几年茶树基因分离研究已取得了较大进展。但已经登录的茶树基因序列数与其它草本及木本经济植物相比仍有较大差距。今后的研究主要包括茶树基因组计划研究、原创性基因的发掘、充分利用已分离获得的大量模式植物的基因信息等来加快茶树基因的分离工作等（陆建良等，2007）。我们对茶树细胞质苹果酸脱氢酶的研究为植物 cMDH 的研究提供了更多信息，也为 Cs-cMDH 的功能研究、晶体学研究及转基因植物研究奠定了基础。

〔参　考　文　献〕

Birktoft JJ，Fernley RT，Bradshaw RA *et al*.，1982，Amino acid sequence homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenase sequences homology among the 2-hydroxy acid dehydrogenases：mitochondrial and cytoplasmic malate dehydrogenases from a homologous system with lactate dehydrogenase［J］. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*，**79**：6166—6170

Bryan C，Ma MC，Todd W *et al*.，2005. Organelle and translocatable forms of glyoxysomal malate dehydrogenase：The effect of the N-terminal presequence［J］. *FEBS Journal*，**272**：643—654

Carr PD.，Verger D，Ashton AR *et al*.，1999. Chloroplast NADP-malate dehydrogenase：structural basis of light-dependent regulation of activity by thiol oxidation and reduction［J］. *Structure*，**7**：461—475

Chapman AD，Cortés A，Dafforn TR *et al*.，1999. Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases：crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase，alpha-ketomalonate and tetrahydoNAD［J］. *Journal of Molecular Biology*，**285**：703—712

Chollet R，Vidal J，O′Leary MH，1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase：a ubiquitous，highly regulated enzyme in plants［J］. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*，**47**：273—298

Ding Y，Ma QH，2004. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat［J］. *Biochimie*，**86**（8）：509—518

Dong L，Fred JS，Marianne S *et al*.，1994. Mechanism of light

modulation: identification of potential redox-sensitive cysteines distal to catalytic site in light-activated chloroplast enzymes [J]. *Biophysical Journal*, **67** (1): 29—35

Easlon E, Tsang F, Skinner C *et al.*, 2008. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast [J]. *Genes & Development*, **22**: 931—944

Gibson N, McAlister-Henn L, 2003. Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, **278** (28): 25628—25636

Gietl C, 1992. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1100** (3): 217—234

Hanss B, Leal-Pinto E, Teixeira A *et al.*, 2002. Cytosolic malate dehydrogenase confers selectivity of the nucleic acid-conducting channel [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 1707—1712

Heber U, 1974. Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, **25**: 393—421

Isabelle S, Kenth J, Paulette D *et al.*, 2000. Inhibition of the thioredoxin-dependent activation of the NADP-malate dehydrogenase and cofactor specificity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, **275** (28): 20996—21001

Johansson K, Ramaswamy S, Saarinen M *et al.*, 1999. Structural basis for light activation of a chloroplast enzyme: the structure of sorghum NADP-malate dehydrogenase in its oxidized form [J]. *Biochemistry*, **38**: 4319—4326

Kyte J, Doolittle RF, 1982. A simple method for displaying the hydropathic charactor of a protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, **157** (1): 105—132

Lee SM, Kim JH, Cho EJ *et al.*, 2009. A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress [J]. *Cell Death & Differentiation*, **16** (5): 738—748

López-Calcagno PE, Moreno J, Cedeño L *et al.*, 2009. Cloning, expression and biochemical characterization of mitochondrial and cytosolic malate dehydrogenase from *Phytophthora infestans* [J]. *Mycological Research*, **113** (6-7): 771—781

Lu JL (陆建良), Lin C (林晨), Luo YY (骆颖颖) *et al.*, 2007. Progress in functional gene cloning of *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Tea Science* (茶叶科学), **27** (2): 95—103

Luo XY (罗小英), Cui YB (崔衍波), 2004. Transgenic Alfalfa plants overexpressing nodule-enhanced malate dehydrogenase enhances tolerance to aluminum toxicity [J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), **2** (5): 621—626

Miller SS, Driscoll BT, Gregerson RG *et al.*, 1998. Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH [J]. *The Plant Journal*, **15**: 173—184

Musrati RA, Kollarova M, Mernik N *et al.*, 1998. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties [J]. *General Physiology and Biophysics*, **17** (3): 193—210

Nishiyama M, Birktoft JJ, Beppu T, 1993. Alteration of coenzyme specificity of malate dehydrogenase from *Thermus flavus* by site-directed mutagenesis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**: 4656—4660

Ocheretina O, Scheibe R, 1997. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding plant cytosolic malate dehydrogenase [J]. *Gene*, **199**: 145—148

Satoshi H, Ken M, Fumio A *et al.*, 2006. Thioredoxin-*h* 1 reduces and reactivates the oxidized cytosolic malate dehydrogenase dimer in higher plants [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, **281** (43): 32065—32071

Singh K, Paul A, Kumar S *et al.*, 2009. Cloning and differential expression of QM like protein homologue from tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. *Molecular Biology Reports*, **36**: 921—927

Timothy MR, Emily RS, Jorja GH *et al.*, 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, **26** (7): 1628—1635